DOI:10.11931/guihaia.gxzw201812036

西番莲 *PeERG* 基因克隆及其表达模式分析

樊航[1,2]，冉娜[1,2]，李安定[3,4]，张洪亮[4]，胥猛[1,2*]

（1.南京林业大学南方现代林业协同创新中心，南京 210037；2.南京林业大学林学院，南京 210037；3.贵州科学院贵州省山地资源研究所，贵阳 550001；4.贵州科学院，贵阳 550001）

摘要：ERA（*Eecherichia coli* Ras-like protein）蛋白是与已知异三聚体 G 蛋白和小分子 G 蛋白不同的一种新的 GTP 结合蛋白。迄今，还没在木本植物中开展其同源基因 *ERG*（*ERA-like GTPase*）克隆和功能验证的相关报道。本文首次在西番莲新品种‘平塘 1 号’中采用 cDNA 末端快速克隆(RACE)技术克隆鉴定 1 个 *ERG* 基因。西番莲 *PeERG* 基因 cDNA 全长为 1 518 bp，包括 1 260 bp 的开放阅读框、38 bp 的 5’-端非翻译区和 220 bp 的 3’-端非翻译区，该基因编码蛋白由 420 个氨基酸残基组成，其二级结构含有丰富的 α-螺旋和延伸链。PeERG 蛋白不含跨膜区域，也不存在信号肽酶切位点，既在其 N 端有典型的 GTPase 保守结构域（GTPase domain）又在其 C 端有独特的 RNA 结合结构域（KH domain）。系统进化树分析表明，西番莲 PeERG 蛋白和水稻 OsERG1、拟南芥 AtERG1、大肠杆菌 ERA 位于同一进化分枝。实时定量 PCR 检测揭示，*PeERG* 基因在西番莲根、茎、叶、花、果中均有表达，叶中表达最高；同时该基因响应低温胁迫信号，其表达呈动态变化模式。本研究首次鉴定和描述了木本植物西番莲的 *ERG* 基因，这些研究发现将有助于进一步探究 *ERG* 基因在植物中的生物学功能及其作用机制，为深入挖掘西番莲特异基因资源提供参考。

关键词：ERA 蛋白，西番莲，RACE，表达模式，G 蛋白，低温胁迫

中图分类号：Q943　　　　**文献标识码：**A

Cloning and expression analysis of *EGR* gene from *Passiflora edulis*

FAN Hang[1,2], RAN Na[1,2], LI Anding[3,4], ZHANG Hongliang[4], XU Meng[1,2*]

(1.*Co-Innovation Center for Sustainable Forestry In Southern China*, *Nanjing Forestry University*, Nanjing 210037, China; 2.*College of Forestry*, *Nanjing Forestry University*, Nanjing 210037, China; 3.*Institute of Mountain Resources*, *Guizhou Academy of Sciences*, Guiyang 550001, China; 3.*Guizhou Academy of Sciences*, Guiyang 550001, China)

Abstract: Different from the known trimetical G protein and small GTPase, ERA (*E. coli* Ras-like protein) is a new GTP-binding protein. Up to now, there are no reports on cloning and functional verification of *ERG* (*ERA-like GTPase*) homologous gene in woody plants. In this study, one *ERG* gene was firstly isolated from a cold-tolerant variety of *P. edulis* (‘Pingtang 1’) through the rapid amplification of cDNA ends (RACE). The full-length sequence of *PeERG* cDNA was 1 518 nucleotides, including a 1 260 bp open reading frame (ORF), flanked by a 38 bp 5’-untranslated region (UTR) and a 220bp 3’-UTR. PeERG may encode a protein of 420 amino acids, and its secondary structure was rich in alpha helix and extended strand. PeERG protein did not contain both transmembrane region and signal peptidase cleavage site, and had two conserved domains: a

基金项目：贵州省科技计划项目（[2016]2525，[2017]5720-003， [2017]2570-2）；广州市科技计划项目(201604020006) [Supported by the Key Science and Technology Program of Guizhou ([2016]2525, [2017]5720-003, [2017]2570-2); the Science and Technology Program of Guangzhou (201604020006)] 。

作者简介：樊航(1994 -)，女，河南义马人，硕士，主要从事林木生物技术研究，(E-mail)fanhang_gz@163.com。

***通信作者：**胥猛，博士，副教授，研究方向为林木遗传育种，(E-mail)xum@njfu.edu.cn, mengxu412@126.com。

GTPase domain and a KH domain. Phylogenetic tree revealed that PeERG was clustered into the same clade as OsERG1, AtERG1 and ERA. Using real-time RT-PCR, the transcripts of *PeERG* were detectable in various tissues (roots, stems, leaves, flower and fruit), and its dynamic expression pattern under low temperature stress was analyzed. Altogether, one *ERG* homologous gene was isolated from woody plants for the first time. These results will be valuable for further study of the biological function of ERG in plants and enrich the excellent genetic resources of *P. edulis*.

Key words: *Eecherichia coli* Ras-like protein, *Passiflora edulis*, RACE, expression pattern, G protein， low temperature stress

西番莲（*Passiflora edulia*）属于西番莲科西番莲属草质或半木质常绿藤本植物，花朵鲜艳优美，果汁风味独特、芳香怡人，俗称百香果、激情果、番石榴、巴西果等，原产南美洲巴西至阿根廷一带。目前作为国内水果市场的“新宠”，西番莲在台湾、福建、广东、广西、海南和云南等地区栽培推广（周玉娟等，2008），其商业化品种主要有紫果、黄果、黄果与紫果杂交品种等 3 大类，其中紫果品种在我国栽培面积最大（郑文武等，2008）。西番莲具有较高的营养价值和药用效果，其果实含有多种人体必需的氨基酸、蛋白质、还原糖、维生素等（黄苇等，2003）；其果汁占鲜果重量的 35～38%，果皮占 50～55%，种子占 5～8%；干果皮中含果胶 20%，粗纤维 25%（张佳艳和任仙娥，2016）。西番莲果汁具有芒果、石榴、柠檬等多种水果的浓郁香味，风味独特，具有“果汁之王”的美称（曾绍校等，2014）。以西番莲为主要原材料，添加适量奶粉、胡萝卜研制出的复合保健饮料，具有高维生素高优质蛋白的特点（殷建忠等，2005）。西番莲果皮可提取色素和果胶，也可制作食用纤维和果脯；其种子含油率达 21%~25%，用其压榨出的食用油品质高、人体吸收率可达百分之九十以上，有着非常高的营养价值和经济前景（徐智和汤利，2012）。西番莲叶片水提物具有抗炎作用（Montanher et al., 2007），果肉和种子中的多酚成分具有良好的抗氧化特性（Lopez-Vargas et al., 2013）；进一步的研究表明低剂量西番莲地上部分提取物有较好的抗焦虑作用，而高剂量提取出有较好的镇定作用（Deng et al., 2010; Li et al., 2011）。此外，西番莲还具有抗肿瘤、清热降火、止咳化痰等功能（Chen and Guo,1999; Liu et al., 2017）。

最早在大肠杆菌（*Eecherichia coli*）中发现的 ERA 蛋白（*E. coli* Ras-like protein）普遍存在于原核和真核生物（Abu et al., 1999），它是一类新的 GTP 结合蛋白亚家族，既在其 N 端有典型的 GTPase 保守结构域(GTPase domain)又在其 C 端有独特的 RNA 结合结构域(KH domain)，从而不同于异三聚体 G 蛋白和单体小分子 G 蛋白两个亚族（Abu et al., 1999；杨青青，2010）。植物中存在 ERA 的同源蛋白 ERG（ERA-like GTPase），Ingram 等（1998）首次报道了金鱼草（*Antirrhinum majus*）的 EGR 蛋白及其编码基因。拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）基因组中存在两个同源的 *ERG* 基因，*AtERG1* 和 *AtERG2*（Suwastika et al., 2014；Cheng et al., 2018）。此外，在烟草（*Nicotiana benthamiana*）、拟南芥、水稻（*Oryza sativa*）等高等植物中也存在包含两个串联重复的 GTP 结合结构域（GTP-binding domain）和一个 CTD 结构域（C-terminal domain）的 DER 蛋白（Double Era-like GTPase）(Jeon et al., 2013；Cheng et al., 2018)。这些 *ERG* 基因在植物的生长发育过程中发挥重要作用。

植物 ERG 蛋白定位于线粒体或叶绿体，它们在植物的生长发育过程中扮演重要角色（Ingram et al., 1998；Suwastika et al., 2014；Cheng et al., 2018）。迄今，还没有木本植物 *ERG* 基因克隆和功能验证的相关报道。西番莲抗寒新品种‘平塘 1 号’，经受过 2008 年中国南方雪凝冰冻极端天气的考验，是目前选育出的唯一能在贵州喀斯特山区不经任何保暖防护措施而在零下温度条件能顺利越冬的西番莲新种质。课题组前期开展了西番莲抗寒性状的分子调控模式研究（Liu et al., 2017），差异基因表达谱分析发现，*ERG* 基因参与调控西番莲低温应答响应。本研究以此为切入点，通过 RACE 技术克隆西番莲 *ERG* 基因，开展该基因编码蛋白质序列的同源性比对、保守结构域及系统进化分析，并利用实时定量 PCR 平台检测该转录本在低温胁迫条件下的动态变化模式，为深入揭示 *ERG* 基因在植物生长发育和逆境应答响应中的生物学功能提供新思路。

1 材料与方法

1.1 植物材料及低温胁迫试验

西番莲抗寒新品种‘平塘 1 号’材料来自于贵州省平塘县西番莲种质资源库（106 °48′45.44″ E； 25 °44′24.77″N；海拔 884 m），其不同组织器官根、茎、叶、花、果（R、S、L、Fl、Fr）采集于 2 年生的大田扦插苗。盆栽的 1 a 生扦插苗，用于 4 ℃低温胁迫及 25 ℃常温恢复试验，并在其低温胁迫 0 h（对照）、1 h（LST-1h）、4 h（LST-4h）、8 h（LST-8h）、24 h（LST-24h）、72 h（LST-72h）及其放置于常温恢复 1 h（NTR-1h）、4 h（NTR-4h）、8 h（NTR-8h）、24 h（NTR-24h）、72 h（NTR-72h）等 11 个时间点取其叶片用于目的基因在低温胁迫及常温恢复过程中的表达谱分析。所用三个生物学重复的上述样品经液氮速冻后保存于-80 ℃超低温冰箱备用。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用天根生物科技（北京）有限公司提供的 RNAprep Pure Plant Kit（TIANGEN，北京）抽提纯化植物总 RNA，并用宝生物工程（大连）有限公司的 PrimeScript^{TM}RT Master Mix（TaKaRa，大连）进行反转录合成 cDNA 用于后续基因表达分析。

1.3 cDNA 末端快速克隆（RACE）

根据实验室前期研究获得的候选基因 unigene 序列（Liu et al., 2017），设计 PCR 引物（表 1），以‘平塘 1 号’叶片 cDNA 为模板，开展候选基因片段的 PCR 扩增和测序验证。基于测序验证获得的基因片段序列设计 RACE 特异引物（表 1），按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 操作指南进行 3’-RACE 和 5’-RACE 巢式 PCR 扩增，并经 PCR 产物回收、连接、转化、测序和拼接，预测其开放阅读框（open reading frame, ORF）。最后设计 ORF 扩增引物（表 1），完成 ORF 的 PCR 扩增和测序验证。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer_ID	正向引物（5’-3’） Forward PCR primer （5’-3’）	反向引物（5’-3’） Reverse PCR primer （5’-3’）
PeERG _Unigene *PeERG*_基因片段	GACGGCGACGAAGAGGACGAAG AA	TGGCCCAGAGCAAGACAACGTAG
PeERG _3OUTER *PeERG*_3’外引物	CCGATAAGCACAGACAACAAGGC	ACTCTGCGTTGATACCACTGCTTGCC CTATAGTGAGTCGTATTAG
PeERG _3INNER *PeERG*_3’内引物	ATGAAGAATGTCCGCAGTGCTG	GCCCTATAGTGAGTCGTATTAG
PeERG _5OUTER *PeERG*_5’外引物	GCGAGGCATGGAATCATCCTGTG CTAA	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC AGTGGTATCAACGCAGAGT
PeERG _5INNER *PeERG*_5’内引物	CAACAAAAGGGACGGCTACGAA	CTAATACGACTCACTATAGGGC
PeERG _ORF 开放阅读框	ATGGAGCTAGTTTTAAACGTCTC	TAATGCTGCGATTTTCCCTC
PeERG _qRT-PCR *PeERG* 定量引物	CAGATGCGGATTAGCGAGC	CGTCTTCTTCGTCCTCTTC
eIF-5A_qRT-PCR 内参基因定量引物	TGGGCCGATGTCCTTGAGAGA	GGATGACTTGAGGCTCCCAACTG

1.4 生物信息分析

BioEdit 软件用于 3’-RACE 和 5’-RACE 序列比对拼接，ORF 预测借助于 FGENESH 软件。Expasy Protparma 和 ProtScale 在线程序用于分析蛋白质分子量、理论等电点、氨基酸组成以及疏水性。蛋白质二级结构、三级结构、跨膜区、信号肽、亚细胞定位分别采用 SPOMA、SWISS-MODEL、TMHMM 、SignalP 和 Cell-Ploc2.0 工具进行。序列多重比对使用 Clustal X2 软件。系统进化树构建采用 MEGA7 软件中的邻接（Neighbor Joining，NJ）法进行构建。

1.5 实时定量 PCR

以来源于不同组织和不同时长低温胁迫材料的 cDNA 为模板，使用 Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂（Thermo Fisher Scientific，美国），在 ViiA 7 平台上开展目的基因实时定量 PCR 检测。每个样品三次技术重复，以 eIF-5A 为内参（表 1），采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对表达量分析。

2 结果与分析

2.1 西番莲 *PeEGR* 基因 cDNA 全长序列分析

经 3’-RACE 和 5’-RACE 巢式 PCR 扩增、测序拼接及其 ORF 预测与测序验证，最终获得目的基因全长 cDNA 序列；经 NCBI 数据库 BLAST 比对，该基因与其他植物 EGR 基因有较高同源性，故将其命名为 *PeEGR*。西番莲 *PeERG* 基因 cDNA 全长为 1 518 bp，包括 38 bp 的 5’-端非翻译区（5’-UTR）和 220 bp 的 3’-端非翻译区（3’-UTR），其 ORF 长度为 1 260 bp （图 1）。*PeEGR* 基因在 39-41 位为起始密码子 ATG，下游存在同框终止密码子 TGA 和 polyA 尾。

```
1                    GGGGATCATCACTAAGGAACATATCTAAACGAGCTCCCAGA

39      ATGGAGCTAGTTTTAAACGTCTCTCCTACTCTTCCCCGCCAGAAATTCTTATTCAGCTCC
         M  E  L  V  L  N  V  S  P  T  L  P  R  Q  K  F  L  F  S  S
99      TTAACCACCAAGTGTCGCAGCTTTTGTAATAAGCGTTTCCAGGTCCAGGTAACCAGTGGC
         L  T  T  K  C  R  S  F  C  N  K  R  F  Q  V  Q  V  T  S  G
159     CGTAGAAACACAAAAGTCTTGTTCTCAATGAAAGAGCAACCACAGATGCGGATTAGCGAG
         R  R  N  T  K  V  L  F  S  M  K  E  Q  P  Q  M  R  I  S  E
219     CAAGGTTTCGACGACGACGGCGACGAAGAGGACGAAGAAGACGAGGAGGACGAAGATGAG
         Q  G  F  D  D  D  G  D  E  E  D  E  E  D  E  E  D  E  D  E
279     GAGAGTCTAAGCGGAGACGAGTCTAGTTATTTGTCATTGACTGAGAAACCTGACCGTCAA
         E  S  L  S  G  D  E  S  S  Y  L  S  L  T  E  K  P  D  R  Q
339     ATGGCTTTGCTTGACGAGTATGAGGTGGAAGAACTCGACTACAGCTCTGATCCTAATCAC
         M  A  L  L  D  E  Y  E  V  E  E  L  D  Y  S  S  D  P  N  H
396     AAAAGCGGTTATGTGGCCGTGGTTGGGAAACCTAATGTAGGAAAGAGCACGCTTTCCAAT
         K  S  G  Y  V  A  V  V  G  K  P  N  V  G  K  S  T  L  S  N
459     CAAATGATAGGACAAAAACTGTCAATTGTAACCGATAAGCCACAGACAACAAGGCACCGG
         Q  M  I  G  Q  K  L  S  I  V  T  D  K  P  Q  T  T  R  H  R
519     ATTCTTGGTATCTGTTCTGGCCCAGAATATCAGATGATACTTTATGATACGCCTGGTGTT
         I  L  G  I  C  S  G  P  E  Y  Q  M  I  L  Y  D  T  P  G  V
579     ATCGGGAAGAAAATGCACAAGTTGGATTCTATGATGATGAAGAATGTCCGCAGTGCTGCT
         I  G  K  K  M  H  K  L  D  S  M  M  M  K  N  V  R  S  A  A
639     GTCAATGCGGACTGTGTGCTAGTTATTGTTGATGCGTGTAAAGCACCCGGAAAAATTGAT
         V  N  A  D  C  V  L  V  I  V  D  A  C  K  A  P  G  K  I  D
699     GAAGTGCTAGAAGAAGGCATGGGAAGCCACAAAGAAAAACTAGCCACCTTGCTCGTATTG
         E  V  L  E  E  G  M  G  S  H  K  E  K  L  A  T  L  L  V  L
759     AATAAGACAGATCTGATTAAACCTGGTGAAATTTCAAAGAAAATTGAGTGGTATGAGAAA
         N  K  T  D  L  I  K  P  G  E  I  S  K  K  I  E  W  Y  E  K
819     TTTACAGATGTTGATGAGATCATACCTGTGAGTGCAAAATATGGTCATGGTGTGCAAGAT
         F  T  D  V  D  E  I  I  P  V  S  A  K  Y  G  H  G  V  Q  D
879     GTCAAGGACTGGATACTGTCGAAACTTCCTAGTGGACCCGCATATTATCCAAAGGACATT
         V  K  D  W  I  L  S  K  L  P  S  G  P  A  Y  Y  P  K  D  I
939     GTTAGTGAGCATCCAGAGAGATTCTTTGTGGCTGAAATTGTGAGAGAAAAGATTTTTCTG
         V  S  E  H  P  E  R  F  F  V  A  E  I  V  R  E  K  I  F  L
999     CAATTCCGTAATGAAGTTCCTTATGCTTGCCAGGTCAATGTGGTGAACTATAAAGCCAGG
         Q  F  R  N  E  V  P  Y  A  C  Q  V  N  V  V  N  Y  K  A  R
1059    CCAACAGCAAAGGACTTCATACAAGTGGAGATTGTTGTGGAGAAAAACACACAGAAGATA
         P  T  A  K  D  F  I  Q  V  E  I  V  V  E  K  N  T  Q  K  I
1119    ATCATCATTGGAAAAGAAGGGAAGGCATTGAAGTTACTTGCAACTGCTGCTAGGCTTGAC
         I  I  I  G  K  E  G  K  A  L  K  L  L  A  T  A  A  R  L  D
1179    ATTGAAGATTTCTTGCAGAAAAAAGTGTATCTCGAGGTAGTAGTTAAAGTGAAGGAAAAC
         I  E  D  F  L  Q  K  K  V  Y  L  E  V  V  V  K  V  K  E  N
1239    TGGCGACAAAATGAAGGGCTTTTGAAGCACTATGGCTACGGAGGGAAAATCGCAGCATTA
         W  R  Q  N  E  G  L  L  K  H  Y  G  Y  G  G  K  I  A  A  L
1299    TGACATTCAAGTTTTGTCCGCTTTGGCATTCCACCGGCAAATGCGGGTTAGGAGGTCATG
         *
1359    TTTATTGTATTCGATGTTAGATGCTTGTACATTGGCATCCGAGTAAATTTGACCTTTCAC
1419    AGCTAACATAGAATCCTTGTTGCTGTAAATCTTGGGAAATTTTGTACGGAGCTTTGATTT
1479    TATTATTCGTAGCCGTCCCTTTTGTTGCAAAAAAAAAAAA        1518
```

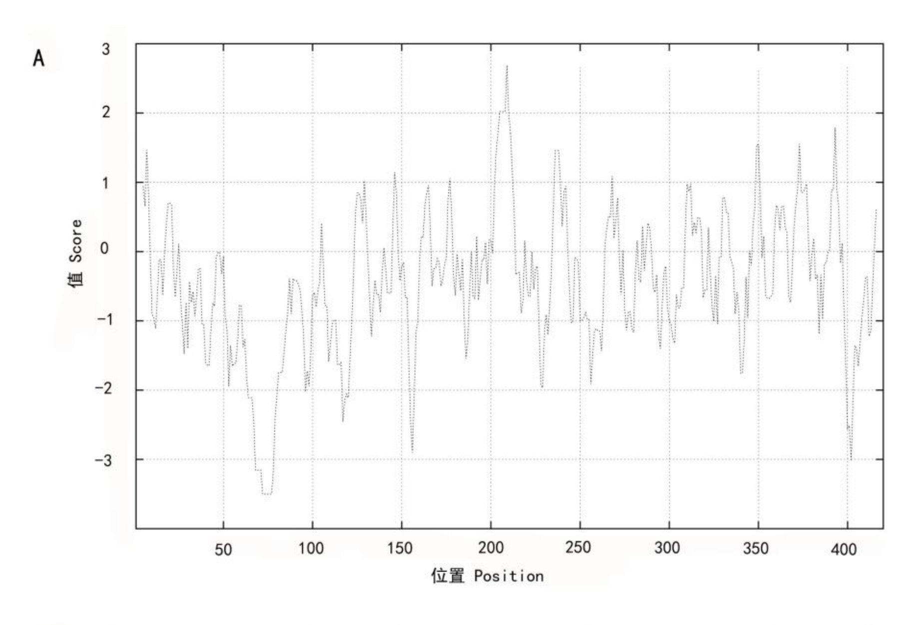
图 1 西番莲 *PeERG* 基因核酸和氨基酸序列

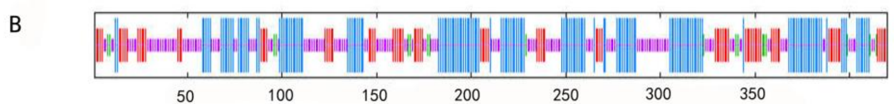
Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *PeERG*

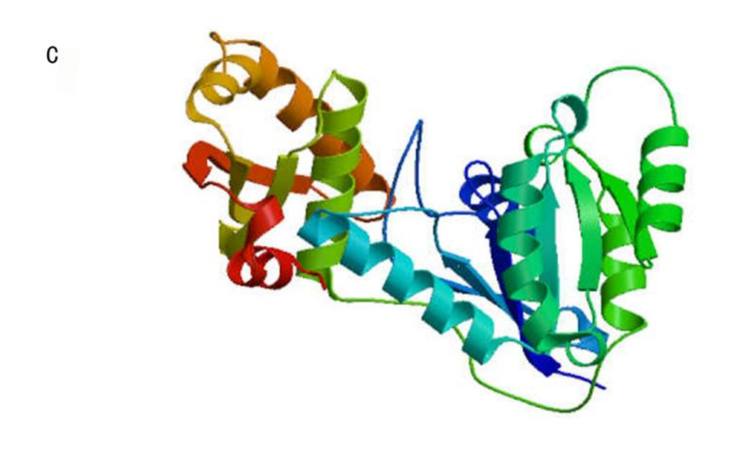
PeEGR 基因编码 420 个氨基酸，预测其编码蛋白质的相对分子量（MW）为 47.57 kD，理论等电点(pI)是 5.53；带负电荷残基总数（Asp+Glu）67 个，带正电荷残基总数(Arg+Lys) 58 个；不稳定指数(instability index） 为 38.35，属于稳定蛋白；总平均亲水性(grand average of hybropathicity, GRAVY）为-0.431，预测该蛋白是亲水性蛋白。蛋白质亲疏水性序列谱见图中可以看出（图 2：A），PeEGR 蛋白质同时具有疏水性和亲水性区域，且亲水性氨基酸残基明显多余疏水性氨基酸残基。亲水区域最高值（Score = -3.500）出现在第 86~91 个氨基酸残基，疏水区域的最高值（Score =2.689） 出现在第 223 个氨基酸残基（图 2：A）。

2.2 PeEGR 蛋白高级结构预测

蛋白质跨膜区（TMHMM）和信号肽分析（SignalP）结果显示，西番莲 *PeERG* 基因编码蛋白质序列不具有跨膜区域，也不存在信号肽酶切位点，推测其为非分泌、亲水性蛋白。通过 Cell-PLoc2.0 在线软件预测其定位于叶绿体。西番莲 PeERG 蛋白存在有 20 个 Ser、12 个 Thr 和 8 个 Tyr 等可能的磷酸化位点（NetPhos）；其二级结构有 37.62%的 α-螺旋（Alpha helix）、20.24%的延伸链（Extended strand）、4.52%的 β- 转角（Beta turn）和 37.62%的无规则卷曲（Random coil）（图 2：B）。以 Swiss-Model Workspace 上编号为 3iev.1 的模型作为模板，西番莲 PeERG 蛋白质与其相似性较高的氨基酸位于 120 - 414 位（图 2：C）。







注：**A.** 亲疏水性序列谱；**B.** 二级结构；**C.** 三级结构模型。

Note：**A.** Hydropathy profile；**B.** The secondary structure；**C.** Tertiary structure mode.

图 2 PeERG 蛋白结构预测

Fig.2 PeERG protein structure prediction

2.3 ERA 蛋白质保守结构域分析

经 NCBI 数据库 BLAST 序列比对发现，PeERG 蛋白与其他物种的 ERA 蛋白具有较高的同源性；与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*, AtDER、AtERG2、AtERG1）、大肠杆菌（*Eecherichia coli*, ERA、EcDER）和水稻（*Oryza sativa*, OsERG1）等 ERA 蛋白相似（图 3），西番莲 PeERG 蛋白 N 端有典型 GTPase 保守结构域，该结构域由 G1，G2，G3，G4，G5 四个 box 组成，能够和鸟苷酸结合并水解 GTP；同时在其 C 端有其特异的 KH domain 结构域，从而有别于异三聚体 G 蛋白和小分子 G 蛋白（small GTPase）两个亚族。

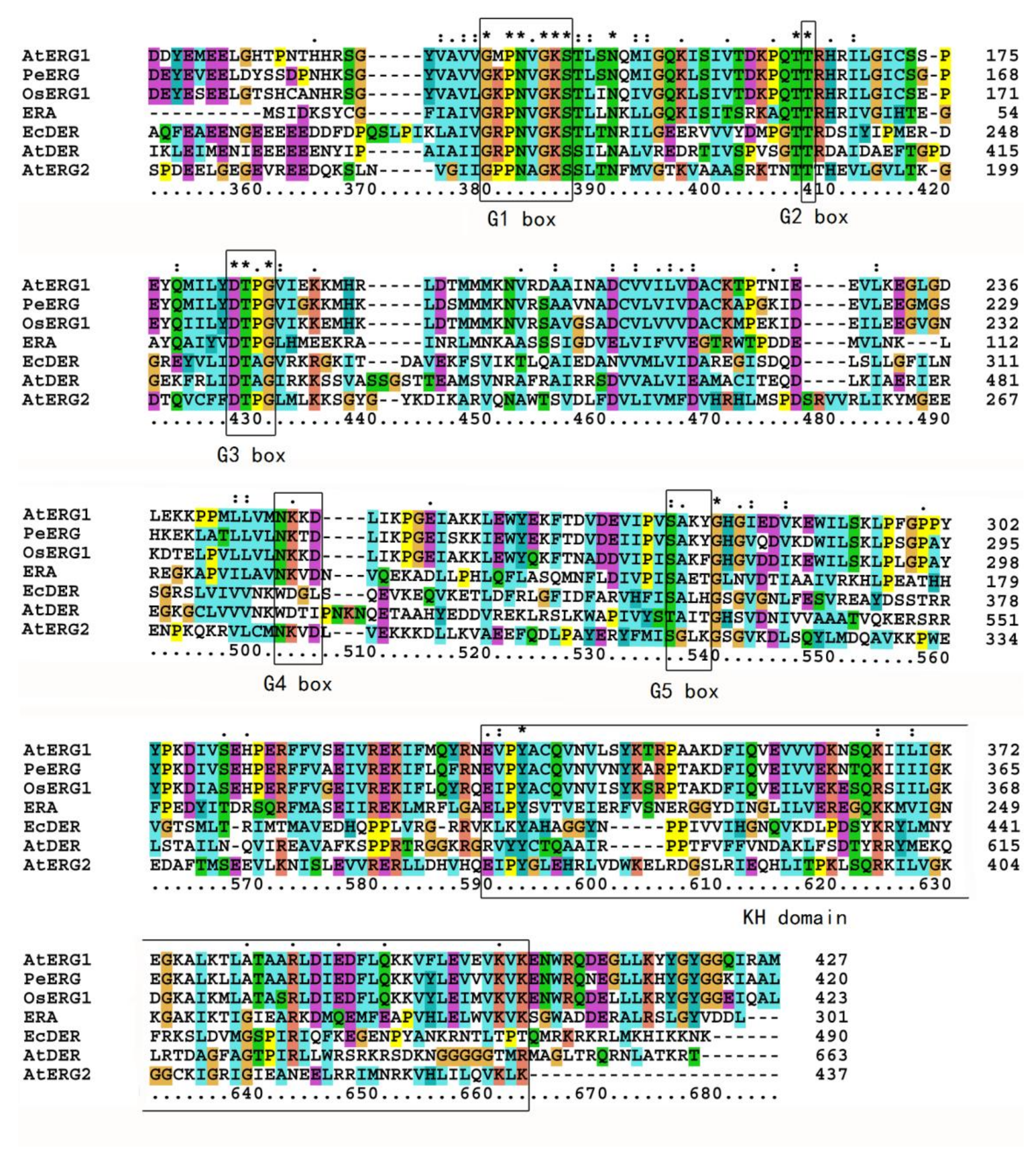


图 3 PeERG 蛋白质保守结构域分析

Fig.3 Conserved domain analysis of PeERG

2.4 ERA 蛋白系统进化树构建

为了探讨 ERA 蛋白在细菌、真菌、植物和动物中的系统进化关系，我们将西番莲（PeERG）、金鱼草（ERG）、拟南芥（AtERG1, AtERG2, AtDER）、番茄（*Solanum lycopersicum*，

SlERG）、马铃薯（*Solanum tuberosum*，StERG）、烟草（NtERG）、黄瓜（*Cucumis sativus*，CsERG）、玉米（*Zea mays*，ZmDER）、水稻（OsERG1, OsERG2, OsDER）、斑马鱼（*Danio rerio*，DrERA）、小鼠（*Mus musculus*，MmERA）、人类（*Homo sapiens*，ERAL1）、大肠杆菌（ERA, EcDER）等 13 个物种的 19 个 ERA（ERG）同源蛋白进行多重序列比对后构建系统进化树（图 4）。西番莲 PeERG 蛋白和水稻 OsERG1、拟南芥 AtERG1、大肠杆菌 ERA 位于同一进化分枝，PeERG 与拟南芥 AtERG1 有更近的进化关系。

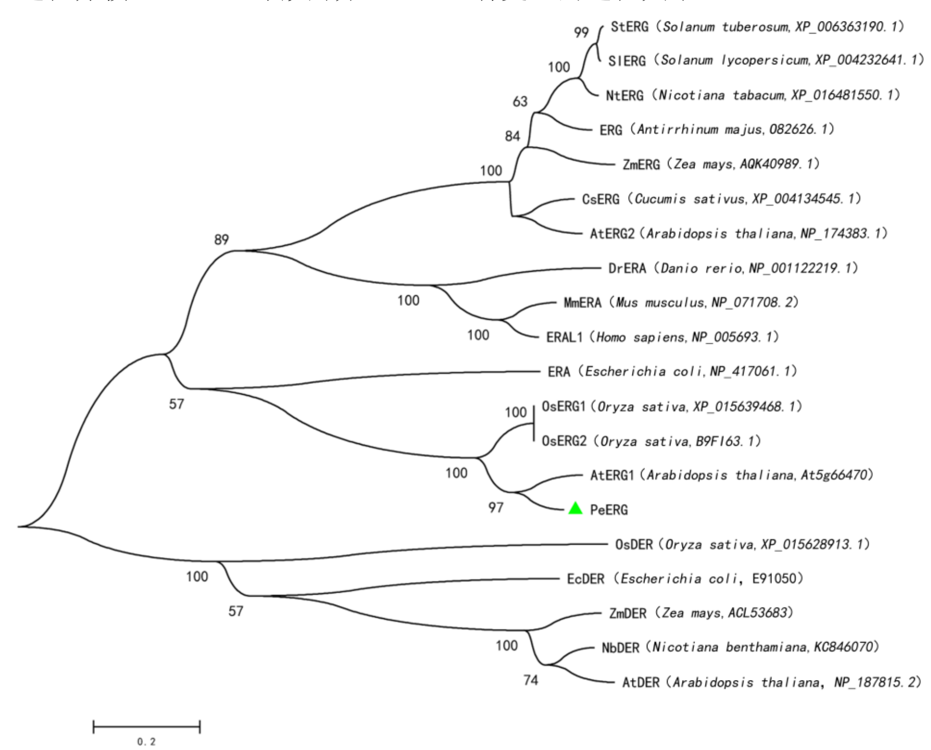
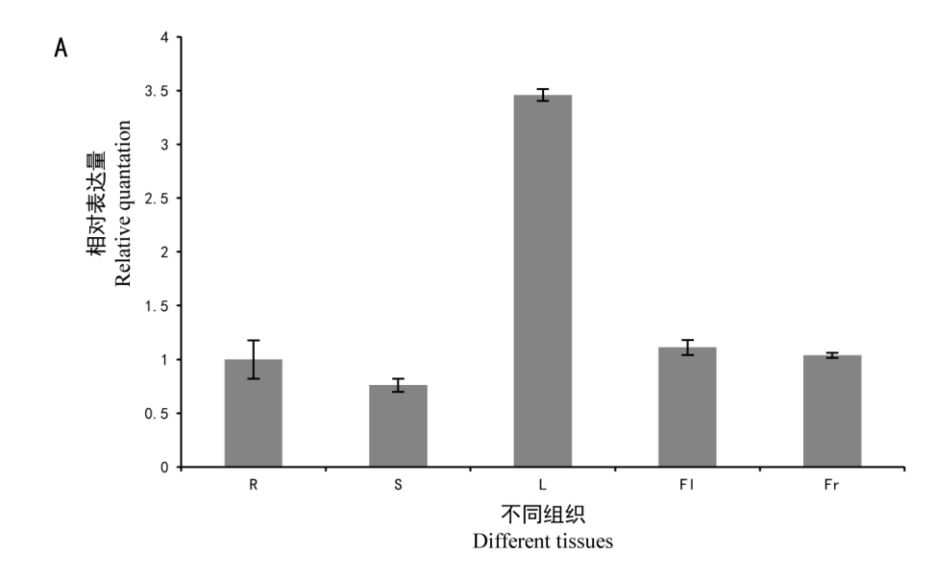


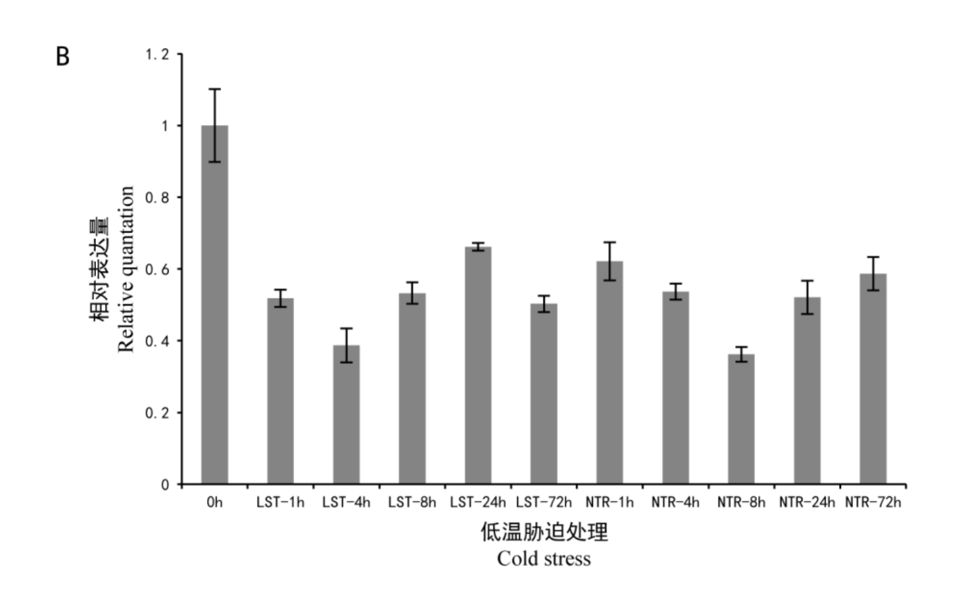
图 4 ERA 蛋白系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of ERAs

2.5 低温胁迫下 *PeERG* 基因的表达模式分析

通过荧光定量 PCR 进行了西番莲 *PeERG* 基因的组织表达差异分析，该基因在根、茎、花和果实中的表达量相当，而在叶中表达量最高（图 5：A）。西番莲不同品种差异基因表达谱分析发现（Liu et al., 2017），*PeERA* 基因可能参与‘平塘 1 号’抗寒性状的分子调控。为了进一步揭示该基因低温胁迫应答的表达模式，以盆栽的 1 年生‘平塘 1 号’扦插苗为材料，开展西番莲低温胁迫及常温恢复试验，并在此过程中于 11 个不同时间点取其叶片材料用于 *PeERG* 基因相对表达量分析。在低温胁迫及常温恢复条件，西番莲 *PeEGR* 基因的表达仅有小幅度的波动，总体而言在 0~24 h 其表达先下降再上升，LST-4h 是其低温胁迫应答最低表达，24~72 h 有所下降；在恢复处理的 1~72 h 时，*PeERG* 基因的表达整体上呈现先下降再上升的趋势，在 NTR-8h 为最低表达峰值（图 5：B）。





注： **R**. 根 ；**S**. 茎；**L**. 叶；**Fl**. 花；**Fr**. 果；低温处理 0、1、4、8、24、72 h 分别用 LST-1 h、LST-4 h、LST-8 h、LST-24 h、LST-72 h 表示；常温恢复 1、4、8、24、72 h 分别用 NTR-1 h、NTR-4 h、NTR-8 h、NTR-24 h、NTR-72 h 表示。

Note: **R**. Root; **S**. Stems; **L**. Leaves; **Fl**. Flower; **Fr**. Fruits; 0 h, LST-1 h, LST-4 h, LST-8 h, LST-24 h, LST-72 h respectively represent the 0, 1, 4, 8, 24, 72 h of cold stress treatment; NTR-1 h, NTR-4 h, NTR-8 h, NTR-24 h, NTR-72 h respectively represent 0, 1, 4, 8, 24, 72 h of room temperature recovery.

图 5 *PeERG* 基因在不同组织以及低温胁迫下的表达

Fig. 5 Expression profiles of *PeERG* in different tissues and under cold stress

3 讨论

G 蛋白是一类广泛存在于真核细胞、具有内源 GTP 酶活性的鸟嘌呤核苷酸结合蛋白，在动植物细胞内跨膜信号转导过程中起着“分子开关”的重要作用。ERA 蛋白因其 C 末端存在与 RNA 或生物膜特异结合的 KH domain 结构域，有别于异三聚体 G 蛋白及小分子 G 蛋白，属于一类新的 GTP 结合蛋白亚家族，不仅存在大肠杆菌、酿酒酵母，而且在高等动

植物以及人类细胞中均含有其同源蛋白。在原核生物中，ERA 蛋白在 DNA 复制、蛋白质翻译以及细胞周期调控等生物学过程中发挥重要作用（Abu et al., 1999；杨青青，2010）；而真核生物 *ERA* 基因起源于原核生物，两者之间的蛋白序列具有较高相似性，动物 ERA 蛋白参与细胞周期调控、可能与肿瘤发生密切相关（杨青青，2010）。然而，有关高等植物 *ERG* 基因克隆和功能研究的相关报道尚少。

金鱼草 ERG 蛋白定位于线粒体，可能通过影响线粒体的分裂参与调控植株受精作用后胚珠发育成种子的过程。金鱼草 *ERG* 基因在各个组织器官中均有表达，其缺失突变体植株不能产生正常发育的种子（Ingram et al., 1998；杨青青 2010）。拟南芥中存在 *AtERG1* 和 *AtERG2* 两个 *ERA* 同源基因（杨青青，2011；Suwastika et al., 2014），其编码蛋白分别定位于叶绿体和线粒体。*AtERG2* 基因主要在拟南芥叶脉、莲座叶表皮毛、成熟花粉和胚珠，其编码蛋白介导线粒体核糖体小亚基成熟及线粒体蛋白的翻译而调控早期种子的形成和发育（Cheng et al., 2018）。

温度是决定植物地域分布的主要限制因素。西番莲一般在热带及亚热带地区栽培，生长要求年平均气温在 18 ℃以上，在低温胁迫条件下西番莲会遭到不同程度的伤害，而喀斯特山区适生品种‘平塘 1 号’能在零下温度条件可顺利越冬。为什么‘平塘 1 号’的抗寒性如此出众？经过前期研究发现，*EGR* 基因在不同西番莲品种间显著差异表达（Liu et al., 2017）。以此为切入点，本研究首次从木本植物西番莲中克隆和鉴定了 *ERG* 同源基因，研究发现 *PeERG* 基因在西番莲抗寒新品种‘平塘 1 号’的根、茎、叶、花、果中均有表达，叶中表达最高；在低温胁迫及常温恢复条件下该基因局限于低表达水平的动态变化；其编码蛋白预测定位于叶绿体，具有类似大肠杆菌 ERA 蛋白、金鱼草 ERG 蛋白、拟南芥 AtERG1 和 AtERG2 蛋白的四个保守 G box 和 KH domain。*PeEGR* 基因在抗寒品种‘平塘 1 号’低温胁迫条件下，其转录表达并未被低温诱导而显著性上升或下降；推测该基因分别在抗寒品种和不耐寒品种内均为组成性表达模式，品种间的差异表达显著，然而有关该基因具体的表达调控机制尚待深入研究。本研究首次在木本植物西番莲中鉴定和描述了 *ERG* 基因序列特征和表达模式，不仅有助于进一步揭示其生物学功能和作用机制，也将为深入挖掘西番莲特异种质资源提供理论基础。

参考文献：

CHENG PY, LI HJ, YUAN LL, et al., 2018. The ERA-related GTPase AtERG2 associated with mitochondria 18S RNA is essential for early embryo development in *Arabidopsis*[J]. Front Plant Sci, 9(182): 1-13.

COLETA M, BATISTA MT, CAMPOS MG, et al., 2006. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents[J]. Phytother Res, 20(12): 1067-1073.

DENG J, ZHOU YJ, BAI MM, et al., 2010. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*[J]. J Ethnopharmacol, 128(1): 148-153.

HUANG W, HUANG Q, LUO RN, et al., 2003. Studies on seasonal variability of aroma components and principle sugar acids contents in passion fruit[J]. J S Chin Agric Univ(Nat Sci Ed), 24(4): 84-87. [黄苇，黄琼，罗汝南，等，2003．西番莲香味及主要糖酸物质含量的季节性变化规律研究[J]．华南农业大学学报(自然科学版)，24(4)：84-87.]

INGRAM GC, SIMON R, CARPENTER R, et al., 1998. The *Antirrhinum ERG* gene encodes a protein related to bacterial small GTPases and is required for embryonic viability[J]. Curr Biol, 8(19): 1079-1082.

JEON Y, AHN CS, JUNG HJ, et al., 2014. DER containing two consecutive GTP-binding domains plays an essential role in chloroplast ribosomal RNA processing and ribosome biogenesis in higher plants[J]. J Exp Bot, 65(1): 117-130.

LI HW, ZHOU P, YANG QQ, et al., 2010. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* '*edulis*' and *Passiflora edulis* '*flavicarpa*'[J]. J Ethnopharmacol, 133(3): 1085-1090.

LIU SA, LI AD, CHEN CH, et al., 2017. De novo transcriptome sequencing in *Passiflora edulis* Sims to identify genes and signaling pathways involved in cold tolerance[J]. Forests, 8(11): 435-448.

LOPEZ-VARGAS JH, FERNANDEZ-LOPEZ J, PEREZ-ALVAREZ JA, et al., 2013. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products[J]. Food Res Int, 51(2): 756-763.

MONTANHER AB, ZUCOLOTTO SM, SCHENKEL EP, et al., 2007. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model[J]. J Ethnopharmacol. 109(2): 281-288.

SAYED A, MATSUYAMA S, INOUYE M, 1999. Era, an essential *Escherichia coli* small G-protein, binds to the 30S ribosomal subunit[J]. Biochem Biophys Res Commun, 264(1): 51-54.

SUWASTIKA IN, DENAWA M, YOMOGIHARA S, et al., 2014. Evidence for lateral gene transfer (LGT) in the evolution of eubacteria-derived small GTPases in plant organelles[J]. Front Plant Sci, 5(678): 1-15.

ZENG SX, PENG B, CHENG J, et al., 2014. Study on extraction technology and basic properties of *Passiflora edulis* skin pigment[J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 14(1): 104-113. [曾绍校，彭彬，陈洁，等，2014．响应面法优化西番莲果皮花色苷提取工艺[J]．中国食品学报，14(1)：104-113.]

ZHOU YJ, TAN F, DENG J, 2008. Update view of *Passiflora*[J]. Chin J Chin Mat Med, 33(15): 1789-1793. [周玉娟，谈锋，邓君，2008．西番莲属植物的研究进展[J]．中国中药杂志，33(15)：1789-1793.]

YANG QQ, 2010. Era protein (*E.coli* ras-like protein) - A possible new molecular switch participating in the eukaryotic and prokaryotic cells signal control[J]. J B Inst Edu(Nat Sci Ed), 5(2): 1-6. [杨青青，2010．Era蛋白(*E.coli* ras-like Protein)——一个可能参与真、原核细胞信号调控的新分子开关[J]．北京教育学院学报(自然科学版)，5(2)：1-6.]

YANG QQ, 2011. Initial screening of *Arabidopsis* exogenous *ERG* genes' positive plants[J]. Life Sci Inst, 9(2): 53-55. [杨青青，2011．拟南芥外源ERG基因的阳性苗的初步筛选[J]．生命科学仪器，9(2)：53-55.]